



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM PRODUTO
FARMACÊUTICO POR VOLTAMETRIA CÍCLICA
COM ELETRODO DE OURO**

**Aluno: Otoniel Carvalho de Braga
Orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli
Florianópolis, Agosto de 2006.**

***“tudo posso Naquele que me fortalece”
Filipenses 4:13***

**Dedico este trabalho aos meus pais,
à minha esposa, à minha filha e à
minha avó Edviges *in memoriun*.**

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi desenvolvido no Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos (**GEPEEA**), situado no laboratório 310 do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina sob a orientação do Prof. Dr. Almir Spinelli .

- Ao Ser Supremo criador de todas as coisas, Emanuel, Jeová, Javé, Rei dos Reis e Senhor dos Senhores, Leão da tribo de Judá. Meu Deus Onipotente, Onipresente e Onisciente à Quem serei grato eternamente pela dádiva da vida.
- À meu Pai, Álvaro Jorge Braga, homem íntegro e de imenso caráter a quem muito amo, respeito e admiro.
- Minha Mãe, Mirian Carvalho de Braga, mulher valorosa, amável e extremamente bondosa. Pessoa que amo e para sempre amarei.
- À minha cúmplice, mulher, esposa amada e amante, alma gêmea e companheira de jornada, a ti, Janaina Rubia Pacheco de Braga, digo apenas obrigado, pois não há palavras para expressar minha gratidão. .
- Meu raio de sol, minha princesa, filha amada e estimada, minha pequena flor, Jainara Pacheco de Braga, obrigado simplesmente por existir.
- Ao Professor Dr. Almir Spinelli, por seu tempo concedido a minha pessoa, sua inestimável orientação, seu incentivo, sua amizade e seu entusiasmo por mim presenciado durante este convívio, muito obrigado.
- À todos os Mestres que contribuíram, de modo direto ou indireto, em minha formação, tanto científica quanto pessoal, eu humildemente agradeço.
- À meus irmãos Priscila e Onésimo, pelo apoio.
- À minhas avós Acyria e Maria Julia , que na sabedoria dos seus 91 anos muito me orientaram durante nossas conversas.
- À todos os meus familiares, aqui representados por Jorvelina Braga Souza, pelo apoio afetivo, emocional e também financeiro.
- José Francisco “Falcão” da Silva Souza, que me permitiu conciliar trabalho e estudo.

- À todos os meus amigos, camaradas e conhecidos que torceram e até mesmo sofreram comigo no transcorrer desta gratificante etapa.
- Aos amigos do GEPEEA representados por Ana Karina, Cristine, Franciani e Lidianne pela convivência diária e informações trocadas.
- Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Florianópolis pelo apoio institucional, suporte técnico e pessoal fornecido.
- Às funcionárias da BU-CFM, pela grande ajuda prestada durante minha formação acadêmica.
- À Dn Nair, que sempre nos serve um excelente café de modo cordial e gentil.
- Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	iii
RESUMO.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivos.....	4
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	5
2.1. Reagentes e soluções.....	5
2.2. Amostras.....	5
2.3. Equipamentos.....	6
2.4. Estudo por voltametria cíclica.....	6
2.5. Procedimento para estudo das condições experimentais e obtenção das curvas analíticas por VC	7
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	8
3.1. Comportamento ciclovoltagemétrico da cafeína.....	8
3.1.1. Escolha do eletrólito suporte e pH.....	9
3.1.2. Influência do oxigênio dissolvido.....	10
3.2. Influência da velocidade de variação do potencial.....	10
3.3. Proposta de mecanismo de oxidação da cafeína.....	14
3.4. Aplicação da metodologia.....	14
3.4.1. Otimização das condições experimentais.....	14
3.4.2. Curva analítica para a cafeína.....	15
3.4.3. Determinação da cafeína em formulações farmacêuticas.....	17
4. CONCLUSÃO.....	20
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
6. ANEXO.....	22
6.1. Equações matemáticas.....	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do processo de redução (a) e oxidação (b) das espécies, A, na solução. Os orbitais moleculares (OM) da espécie A quando ocupados são de maior energia que seus OM vagos. A ilustração representa o momento aproximado em que os potenciais padrões, E^\bullet , de A/A^- e A^+/A são alcançados, respectivamente.....	2
Figura 2. Fórmula estrutural da cafeína.....	3
Figura 3. Voltamograma cíclico completo para: (a) uma solução $1,00 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de cafeína no eletrólito suporte $HClO_4$ 0,10 mol L^{-1} e (b) branco. $v = 10$ mV s^{-1}	8
Figura 4. Voltamogramas do eletrólito suporte $HClO_4$ 0,10 mol L^{-1} (branco) ,com e sem desaeração (N_2), com eletrodo de ouro (EAu) e após a adição de cafeína.....	9
Figura 5. Voltamogramas cíclicos para uma solução $1,00 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de cafeína em $HClO_4$ 0,10 mol L^{-1} para um aumento de v de 5 a 100 mV s^{-1}	10
Figura 6. Variação do i_{pa} com v para uma solução $1,00 \times 10^{-3}$ de cafeína em $HClO_4$ 0,10 mol L^{-1}	11
Figura 7. Variação do E_{pa} com v para uma solução $1,00 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de cafeína em $HClO_4$ 0,10 mol L^{-1}	12
Figura 8. Variação da i_{pa} com $v^{1/2}$ para uma solução $1,00 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de cafeína em $HClO_4$ 0,10 mol L^{-1}	13
Figura 9. Variação da função corrente ($i_{pa} \cdot v^{-1/2}$) do pico de oxidação da cafeína com a velocidade (v) para uma solução $1,00 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de cafeína em $HClO_4$ 0,10 mol L^{-1}	13
Figura 10. Mecanismo de oxidação da cafeína em meio aquoso.....	14
Figura 11. Voltamogramas para diferentes concentrações do padrão de cafeína: (a) branco; (b) $4,00 \times 10^{-4}$; (c) $6,00 \times 10^{-4}$; (d) $8,00 \times 10^{-4}$; (e) $1,00 \times 10^{-3}$; (f) $1,50 \times 10^{-3}$; (g) $2,00 \times 10^{-3}$; (h) $3,00 \times 10^{-3}$; (i) $4,00 \times 10^{-3}$; (j) $5,00 \times 10^{-3}$ e (k) $6,00 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} . Inserção: Dependência da i_{pa} em função da concentração da cafeína.....	16
Figura 12. Voltamogramas obtidos para a determinação de cafeína em amostra de comprimido Coristina [®] d. (a) Branco; (b) 9 mL de amostra, (c-e) adição de 500 μL do padrão de cafeína.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Influencia de ν sobre os parâmetros eletroquímicos do pico anódico obtidos para uma solução $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cafeína em HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$	11
Tabela 2. Parâmetros experimentais otimizados para a análise da cafeína.....	15
Tabela 3. Parâmetros quantitativos do método analítico aplicado para a determinação da cafeína.....	17
Tabela 4. Parâmetros quantitativos do método analítico aplicado para a determinação da cafeína em formulação farmacêuticas (Coristina [®] d) através do método de adição de padrão.....	18
Tabela 5. Resultados obtidos para a quantificação de cafeína em amostra de comprimido de Coristina [®] d.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

®	marca registrada
Σ	somatória
μA	microampère
μL	microlitro
Ag/AgCl	prata cloreto de prata
B	inclinação da curva de calibração / coeficiente angular
BDD	eletrodo de diamante dopado com boro
Cafeína	1,3,7-trimetilxantina
[cafeína]	concentração da cafeína
CME	eletrodo quimicamente modificado
sd	desvio padrão
DP_b	desvio padrão da média aritmética da corrente do branco
RSD	desvio padrão relativo
E	potencial
E°	potencial padrão
EAu	eletrodo de ouro
EGP	eletrodo de grafite pirolítico
E_{pa}	potencial de pico anódico
E_{pc}	potencial de pico catódico
E_r	erro relativo
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
i_{pa}	corrente de pico anódico
$i_{\text{pa}} \cdot v^{-1/2}$	função corrente
i_{pc}	corrente de pico catódico
LC	cromatografia líquida
LD	limite de detecção
$\log v$	logaritmo da velocidade
LQ	limite de quantificação
MeOH	metanol

mg	miligrama
mV	milivolts
mV s ⁻¹	milivolts por segundo
mol L ⁻¹	mol por litro
n	número de medições
OM	orbital molecular
r	coeficiente de correlação
SCE	eletrodo de calomelano saturado
v	velocidade de variação de potencial
V	volts
VC	voltametria cíclica
VOQ	voltametria de onda quadrada
VPD	voltametria de pulso diferencial
vs	versus
X _i	valor individual de uma medição
\bar{X}	média aritmética de um pequeno número de medições

RESUMO

Este trabalho descreve um procedimento eletroanalítico para a determinação da 1,3,7-trimetilxantina, cafeína, um importante alcalóide utilizado na medicina como analéptico no tratamento de envenenamento, estimulante na insuficiência circulatória aguda e diurético, além de ser estimulante do sistema nervoso central. Um estudo do comportamento eletroquímico da cafeína foi realizado através da voltametria cíclica (**VC**). Tendo como eletrólito suporte HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, a cafeína oxidou em um potencial de pico anódico (E_{pa}) $+1,47 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, numa única etapa, apresentando boa definição de pico. A análise dos resultados experimentais mostrou que a oxidação da cafeína é irreversível, sem reação química acoplada à transferência eletrônica, e que a etapa determinante é controlada por transporte de massa difusional. Uma metodologia eletroanalítica por **VC** foi avaliada através da oxidação eletroquímica da cafeína em eletrodo de ouro (**EAu**), a qual é simples, rápida, confiável e válida para a determinação da cafeína em comprimidos. Usando as melhores condições de trabalho, um **LD** de $9,92 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foi encontrado para uma curva de calibração linear no intervalo de $2,0 \times 10^{-4}$ a $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com coeficiente de correlação (**r**) 0,998. Uma recuperação de 99,00 % foi encontrada para a formulação farmacêutica.

Palavras-chave: Cafeína; Eletroquímica; Eletroanalítica.

1. INTRODUÇÃO

A química eletroanalítica resulta em um conjunto de métodos analíticos quantitativos relacionados às propriedades elétricas de uma solução do analito no momento em que o mesmo faz parte de uma célula eletroquímica. As técnicas eletroanalíticas são capazes de fornecer limites de detecção extremamente baixos e uma quantidade enorme de informações que caracterizam e descrevem o comportamento eletroquímico do sistema.

Os métodos eletroanalíticos apresentam vantagens gerais em relação a outros tipos de procedimentos analíticos quantitativos, pois as medidas eletroquímicas são freqüentemente específicas para um estado de oxidação de uma espécie enquanto que a maioria dos outros métodos analíticos revela apenas a concentração total da espécie e sua instrumentação é relativamente barata, além de fornecer informações sobre a atividade fisiológica das espécies químicas [1].

A determinação eletroanalítica resulta de um sistema eletroquímico onde estudos estão voltados aos processos e fatores que afetam o transporte de carga interfacial entre um condutor eletrônico, o eletrodo, e um condutor iônico, o eletrólito, quando um potencial é aplicado e ocorre a passagem de corrente[2].

A célula eletroanalítica é constituída de três eletrodos imersos em uma solução contendo o analito e um excesso de eletrólito não-reativo, o eletrólito suporte. Um dos três eletrodos é o microeletrodo ou eletrodo de trabalho, cujo potencial varia linearmente com o tempo. Suas dimensões são mantidas pequenas para aumentar sua tendência a polarização. Há o eletrodo de referência, geralmente um eletrodo de calomelano saturado (SCE) ou prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), cujo potencial é mantido constante durante o experimento. O contra-eletrodo, geralmente um fio enrolado de platina, serve para conduzir eletricidade da fonte de sinal através da solução para o microeletrodo[1].

Já que o eletrodo de referência apresenta composição constante e potencial fixo, qualquer mudança no potencial da célula será atribuída ao eletrodo de trabalho. Logo, observar ou controlar o potencial do eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência é equivalente a observar ou controlar a energia dos elétrons no interior do eletrodo de trabalho. Deslocando o potencial no eletrodo de trabalho para valores mais negativos, a energia dos elétrons aumenta podendo atingir um nível, alto o suficiente, que os elétrons migram para estados eletrônicos

vagos, de menor energia, nas espécies eletroativas presentes no eletrólito suporte. Neste caso, ocorre um fluxo de elétrons do eletrodo para a solução gerando uma *corrente redutora* (figura 1a). De modo semelhante, a energia dos elétrons pode ser diminuída impondo-se potenciais mais positivos atingindo um ponto em que os elétrons da espécie eletroativa presentes no eletrólito, migram para um estado de energia mais favorável, menor energia, no eletrodo. Este fluxo, da solução para o eletrodo, é a *corrente oxidante* (figura 1b). O potencial crítico onde ocorre este processo é denominado *potencial padrão*, E^\bullet , o qual é específico à substância química do sistema [2].

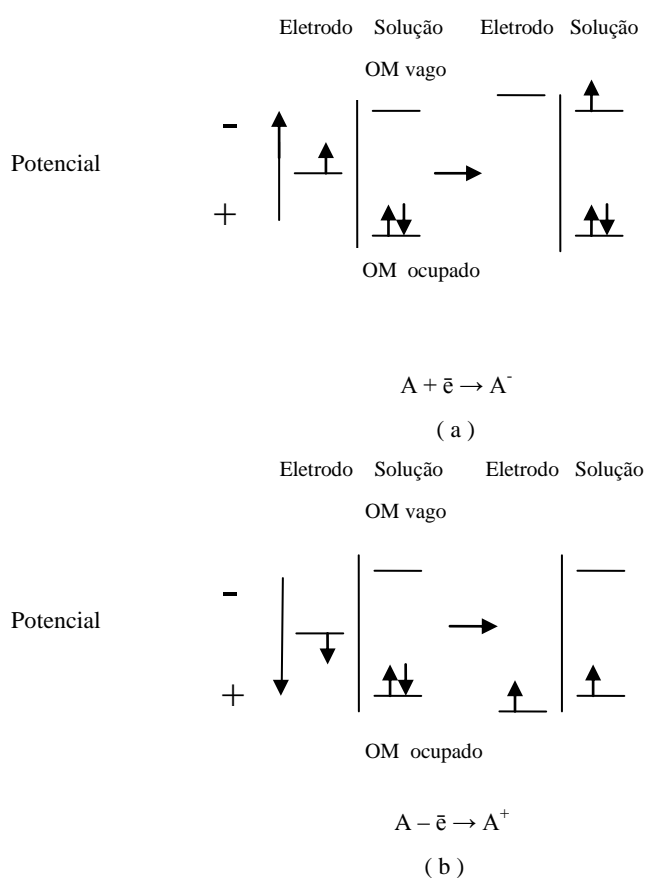


Figura1. Representação do processo de redução (a) e oxidação (b) das espécies, A, na solução. Os orbitais moleculares (OM) da espécie A quando ocupados são de maior energia que seus OM vagos. A ilustração representa o momento aproximado em que os potenciais padrões, E^\bullet , de A/A^- e A^+/A são alcançados respectivamente.

Este trabalho propõe um método para a determinação da 1,3,7-trimetilxantina, a cafeína (figura 2), um alcalóide, derivado da purina, cujo grupo xantina é a 2,6-dioxopurina, que ocorre

no café, no chá, no cacau, no guaraná, na cola e na erva mate. Embora possa ser produzida sinteticamente, em geral é preparada a partir do chá, do pó das folhas do chá ou de seus restos; também pode ser retirada através de máquinas de torrefação de café. A cafeína é anidra e contém uma molécula de água de hidratação.

A presença de grupos carbonílicos, duplas ligações entre carbonos e entre carbono e nitrogênio na estrutura das xantinas, indica que estas substâncias devem ser eletroativas.

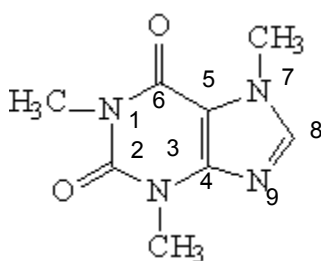


Figura 2. Fórmula estrutural da cafeína.

A cafeína é um pó branco cristalino, de sabor amargo, que pode ser sublimada sem decomposição, quando aquecida. Utilizada na medicina como analéptico no tratamento de envenenamento, estimulante na insuficiência circulatória aguda e diurética. Ela é um estimulante do sistema nervoso central sendo, portanto, ingerida por motoristas e estudantes que pretendem manter-se acordados. A cafeína pode ser letal, se ingerida em grande quantidade e apresenta LD-50, dose letal para matar 50% de indivíduos de um grupo, de 75 mg kg^{-1} .

A cafeína inibe competitivamente a fosfodiesterase, o que provoca um aumento no monofosfato de adenosina cíclico, com conseqüente liberação de adrenalina endógena. Isso ocasiona relaxamento imediato dos músculos lisos dos brônquios e dos vasos sanguíneos pulmonares, estimulação do sistema nervoso central, indução de diurese, aumento da secreção dos ácidos graxos, inibição das contrações uterinas e fraco efeito cronotrópico positivo e inotrópico sobre o coração [3].

Muitos trabalhos são encontrados na literatura cujo objetivo é o desenvolvimento de metodologias para a determinação da cafeína utilizando métodos de cromatografia líquida (LC), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e espectrofotometria. Entretanto, apesar de serem técnicas eficientes, é necessário um consumo excessivo de tempo e solvente para a sua

extração e determinação [4]. Trabalhos para a determinação da cafeína envolvendo técnicas eletroquímicas como voltametria de pulso diferencial (**VDP**) e voltametria de onda quadrada (**VOQ**) também são encontradas na literatura, embora em menor quantidade. Lau e colaboradores desenvolveram um método para a determinação de cafeína em formulações farmacêuticas por **VPD** utilizando o eletrodo de carbono vítreo (**ECV**) para a sua detecção e ácido perclórico (HClO_4)-metanol (MeOH) (1 +1) como solvente e eletrólito suporte [5]. Zen e colaboradores, através da **VOQ**, desenvolveram um método para a determinação da cafeína utilizando um eletrodo quimicamente modificado Nafion-óxido de rutênio pirocloro (**CME**) sendo o HClO_4 o eletrólito suporte [6]. Spătaru e colaboradores publicaram um trabalho de determinação da cafeína via voltametria cíclica (**VC**) através de um eletrodo de diamante dopado com boro (**BDD**) em uma solução tampão Britton-Robinson contendo perclorato de sódio (NaClO_4) como eletrólito suporte [7].

1.1. Objetivos

Considerando-se a grande potencialidade das técnicas eletroquímicas na análise de substâncias em concentrações baixas, este trabalho tem como objetivos:

- Investigar o comportamento eletroquímico da cafeína através da voltametria cíclica (**VC**) em meio aquoso sobre a superfície de um eletrodo de ouro (**EAu**).
- Aplicação de uma metodologia eletroanalítica, adição de analito, para a determinação da cafeína em formulações farmacêuticas, visando obter um método simples, rápido, de baixo custo e suficientemente sensível para possíveis aplicações no controle de qualidade deste fármaco.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A água foi purificada com um sistema de purificação Micro química MQAMA301.

A solução padrão da cafeína 98,5%, cedido pela ACRÓS, foi preparada na concentração de $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em balão volumétrico de 25 mL por dissolução de quantidade apropriada da substância em HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução de HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ utilizada como eletrólito suporte foi preparada através da diluição com água desionizada de HClO_4 70%, Nuclear CAQ PA-ACS, em um balão volumétrico de 200 mL.

As soluções de trabalho foram preparadas por diluição da solução padrão na concentração desejada com o eletrólito suporte momentos antes da utilização ou por adição de alíquotas da solução padrão na célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte.

Para o polimento do eletrodo foi utilizado óxido de alumínio-VETEC (Al_2O_3). Adicionado em pequenas quantidades em pedaços de feltrom.

2.2 Amostras

A cafeína foi determinada em amostras de comprimidos Coristina[®]d – Schering Plough, que contém 30 mg de cafeína, 400 mg de ácido acetilsalicílico, 1 mg de maleato de dexclorfeniraminado e 10 mg de cloridrato de fenilefrina (no rótulo) além de excipientes inativos.

Um comprimido de Coristina[®]d, contendo 30,00 mg de cafeína, foi macerado e dissolvido, em aproximadamente 50 mL do eletrólito suporte HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. A solução ficou em ultra-som por 5 minutos, sendo logo após transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume final completado com o eletrólito suporte HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

À célula eletroquímica foram adicionados 9 mL da solução da amostra, obtendo-se seu voltamograma. Logo após, alíquotas da solução padrão da cafeína foram adicionadas à célula e os voltamogramas da amostra com o padrão de cafeína foram obtidos respeitando um intervalo de tempo entre as adições de 135 s sendo 105 s de agitação para homogeneização da solução após a pré-concentração, onde neste intervalo de tempo foi feito o polimento do eletrodo por 90 s, e 30 s de repouso; tempo de equilíbrio.

2.3 Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato Modelo 263A EG&G PAR em conjunto com um kit de micro célula modelo K0264 com um sistema de multi eletrodos constituídos de um eletrodo de trabalho de ouro (**EAu**), um eletrodo de referência **Ag/AgCl** e um contra eletrodo de platina todos da EG&G PAR acoplado ao software M 270.

As medidas de pH foram realizadas em um potenciômetro ORION Modelo 720A.

Um ultra-som METASOM -14 foi utilizado para a dissolução do analito. Micropipetas de precisão DIGIPET 10-100 e 100-1000 μL e um agitador magnético FANEM Modelo 257 foram utilizados, respectivamente, para adição e homogeneização do sistema.

2.4. Estudos por voltametria cíclica

Os estudos de voltametria cíclica foram realizados após adição do padrão de cafeína, concentração desejada, preparada conforme item 2.1, na célula contendo 9 mL do eletrólito suporte. Como o oxigênio dissolvido não interfere na voltametria anódica da cafeína, a desaeração com nitrogênio (N_2) não se fez necessária e os voltamogramas cíclicos foram registrados após varredura dos potenciais respeitando o intervalo entre +0,10 a +1,70 V vs. **Ag/AgCl** [6].

Com a definição do potencial a ser explorado, foram avaliadas as influências da velocidade de varredura de potencial e a variação da concentração do substrato, visando obter informações prévias sobre o mecanismo eletródico envolvido no processo de oxidação da cafeína.

2.5. Procedimento para estudo das condições experimentais e obtenção das curvas analíticas por VC

Inicialmente 9 mL da solução do eletrólito suporte foram pipetados e introduzidos na célula eletrolítica e o voltamograma do branco foi obtido, a partir da varredura de potencial entre +0,10 a +1,70 V vs. **Ag/AgCl**.

Depois de registrado o voltamograma do branco, uma alíquota da solução padrão da cafeína foi adicionada na célula e o voltamograma da cafeína foi obtido respeitando um intervalo de tempo conforme descrito no item **2.2**. As medidas experimentais para obtenção das curvas analíticas foram realizadas adicionando 5 mL do eletrólito suporte na célula seguido do mesmo procedimento descrito anteriormente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Comportamento ciclovoltamétrico da cafeína

Inicialmente foi estudado o comportamento ciclovoltamétrico da cafeína em **EAu** no eletrólito suporte HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Na figura 3 observa-se o voltamograma cíclico completo, após varredura de potencial na direção positiva de $+0,10$ a $+1,70 \text{ V}$ voltando, em seguida, ao potencial inicial de $+0,10 \text{ V}$ vs **Ag/AgCl**.

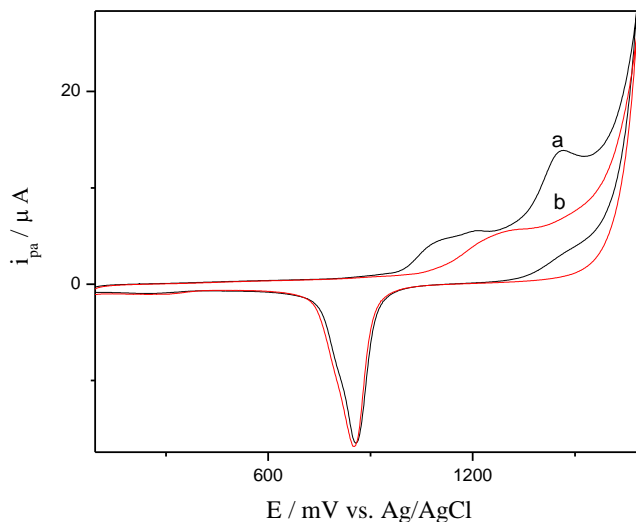


Figura 3. Voltamograma cíclico completo para: (a) uma solução $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cafeína no eletrólito suporte HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e (b) branco. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma cíclico obtido para uma solução $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cafeína mostra um pico bem definido na região de oxidação em $+1,47 \text{ V}$ [1,2].

O voltamograma obtido para o branco (figura 3.b) apresenta uma corrente de pico anódica (i_{pa}) no potencial (E) $+1,28 \text{ V}$ vs. **Ag/AgCl** e uma corrente de pico catódica (i_{pc}) no E $+0,85 \text{ V}$ vs. **Ag/AgCl**. Estudos realizados por Leger demonstraram que voltamogramas com **EAu** em meio ácido apresentam i_{pa} e i_{pc} características devido a adsorção do oxigênio no potencial de pico anódico (E_{pa}) e sua dessorção no potencial de pico catódico (E_{pc}) sobre a superfície do **EAu** [8].

Experimentalmente, verificou-se que a desaeração do sistema não inibe esta característica do **EAu** em meio ácido entretanto, como o pico de adsorção do oxigênio não interfere na i_{pa} em estudo, o **EAu** pôde ser utilizado para a determinação da cafeína (figura 4).

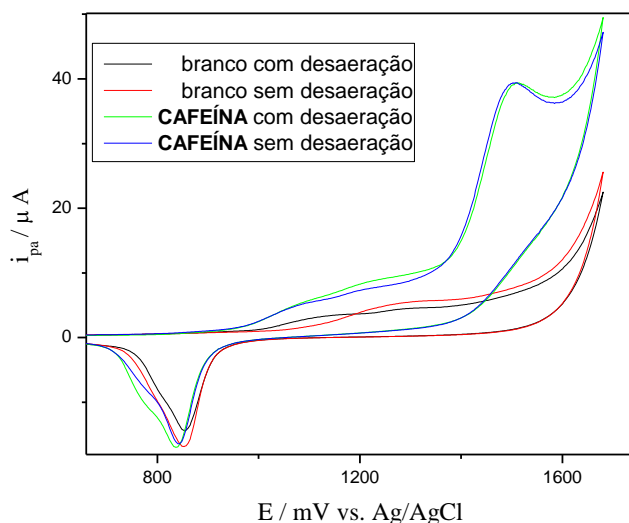


Figura 4. Voltamogramas do eletrólito suporte HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (branco) ,com e sem desaeração (N_2), com eletrodo de ouro (**EAu**) e após a adição de cafeína.

3.1.1. Escolha do eletrólito suporte e pH

Estudos apresentados na literatura mostram que o aumento de pH resulta em i_{pa} menores e mal definidas para a cafeína, sendo o HClO_4 o eletrólito suporte de melhor resposta na sua detecção, com corrente de pico máxima em uma faixa de concentração entre $0,05$ a $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ [5,7]. A concentração do eletrólito suporte utilizado para as medidas voltamétricas foi de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, uma concentração cerca de cem vezes maior que a da espécie eletroativa, e que resultou em um pH 1,10 para o estudo [9].

3.1.2. Influência do oxigênio dissolvido

O oxigênio dissolvido não interfere no pico de oxidação da cafeína, conforme observado nos voltamogramas da figura 4, não sendo necessário, portanto, a desaeração da célula com N_2 antes das medidas voltamétricas [6].

3.2. Influência da velocidade de variação de potencial

O comportamento eletroquímico da cafeína foi estudado avaliando-se a influência da velocidade de variação de potencial (v), no intervalo de 5 a 100 mV s^{-1} , no eletrólito suporte HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sobre o pico de oxidação da cafeína. Os voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cafeína com HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ estão apresentados na figura 5. De acordo com os voltamogramas cíclicos obtidos constata-se que um aumento gradativo da v leva a um acréscimo na corrente de pico anódica.

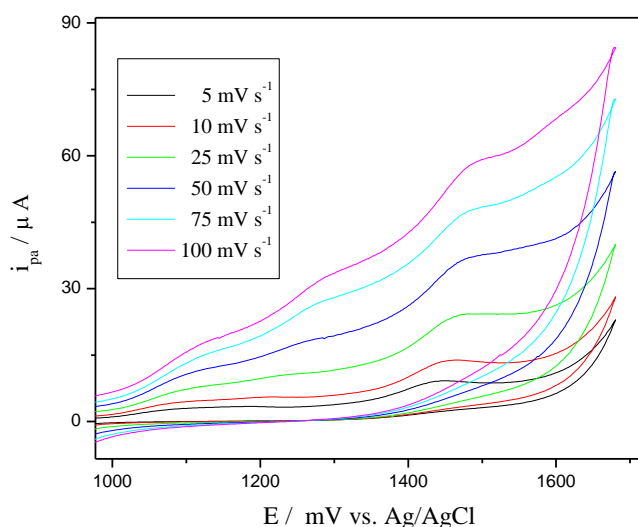


Figura 5. Voltamogramas cíclicos para uma solução $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cafeína em HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ para um aumento de v de 5 a 100 mV s^{-1} .

O gráfico obtido a partir dos valores da i_{pa} em função do aumento da velocidade v de 5 para 100 mV s^{-1} (tabela 1) apresenta um comportamento não linear entre estes dois parâmetros. Comportamento este, característico de um transporte de massa difusional (figura 6)[2, 10, 11, 12].

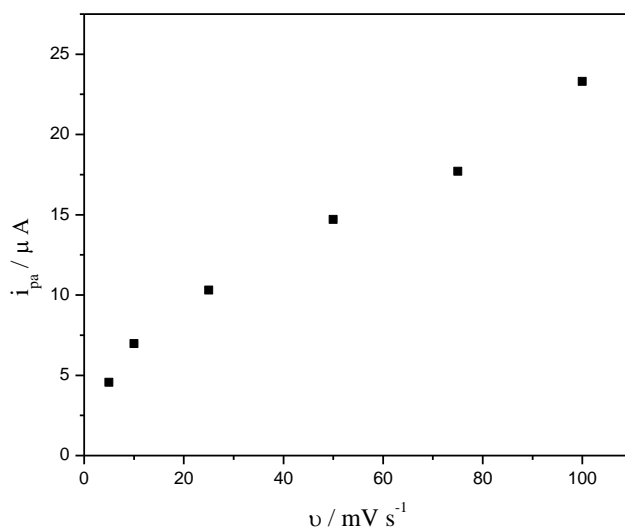


Figura 6. Variação do i_{pa} com v para uma solução $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cafeína em HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 1. Influência de v sobre os parâmetros eletroquímicos do pico anódico obtidos para uma solução $1,00 \times 10^{-3}$ de **CAFEÍNA** em HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

v (mV s^{-1})	i_{pa} (μA)	E_{pa} (V vs. Ag/AgCl)	$v^{1/2}$ (mV s^{-1}) ^{1/2}	$i_{pa} \cdot v^{-1/2}$ ($\mu\text{A V}^{-1/2} \text{s}^{1/2}$)
5,00	4,57	1,45	70,71	64,63
10,00	6,97	1,47	100,00	69,70
25,00	10,30	1,48	158,11	65,14
50,00	14,70	1,49	223,61	65,74
75,00	17,70	1,50	273,86	64,63
100,00	23,30	1,50	316,23	73,68

Um deslocamento do E_{pa} para valores mais positivos (tabela 1) é observado com o aumento da ν (figura 7). Este comportamento está de acordo com o previsto teoricamente para uma transferência eletrônica irreversível ou uma transferência eletrônica perturbada por reações químicas acopladas[2,10].

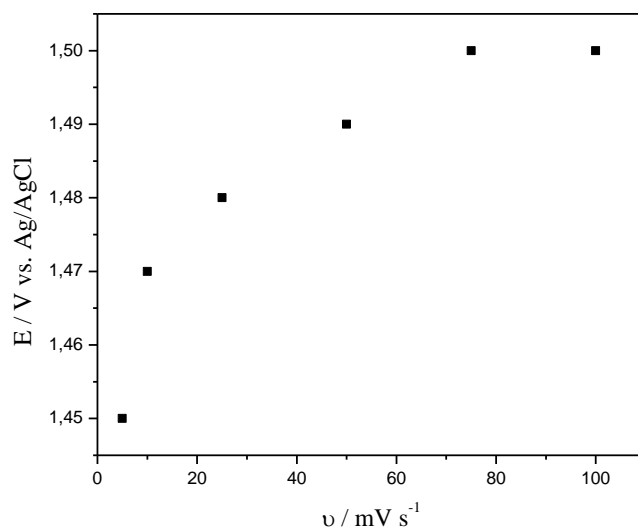


Figura 7. Variação do E_{pa} com ν para uma solução $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cafeína em HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Em sistemas irreversíveis sem complicação cinética, a i_{pa} varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de variação de potencial, $\nu^{1/2}$, passando pela origem dos pontos [2, 10, 11, 12]. Esse comportamento ocorreu com a cafeína como pode ser observado na figura 8.

Um critério bastante utilizado para determinar se a irreversibilidade do processo eletródico é decorrente de uma transferência eletrônica lenta ou de uma reação química acoplada é a análise da variação da função corrente ($i_{pa} \cdot \nu^{-1/2}$) com o aumento de ν (tabela 1). A $i_{pa} \cdot \nu^{-1/2}$ é um parâmetro que independe de ν para processos irreversíveis se a irreversibilidade não for proveniente de reações químicas acopladas ao processo de transferência eletrônica. Assim, a inexistência de um aumento ou diminuição gradual da função corrente com o aumento da ν de 5 para 100 mV s^{-1} para a oxidação da cafeína sugere a ausência de uma reação química acoplada a transferência eletrônica (figura 9) [2, 11,12].

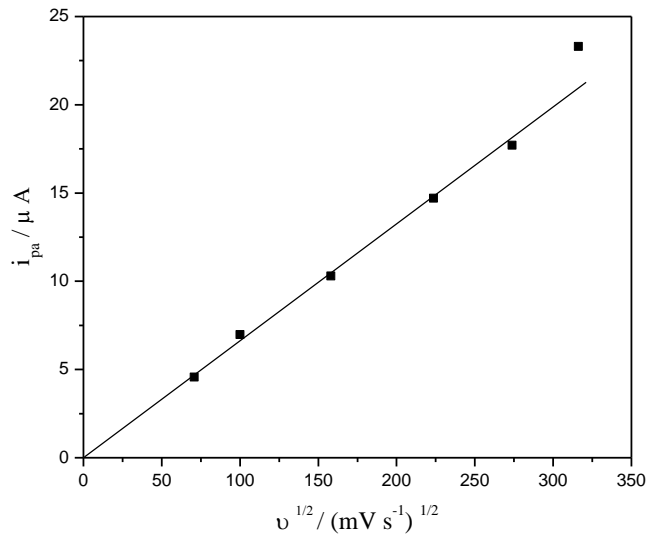


Figura 8. Variação do i_{pa} com $v^{1/2}$ para uma solução $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cafeína em HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

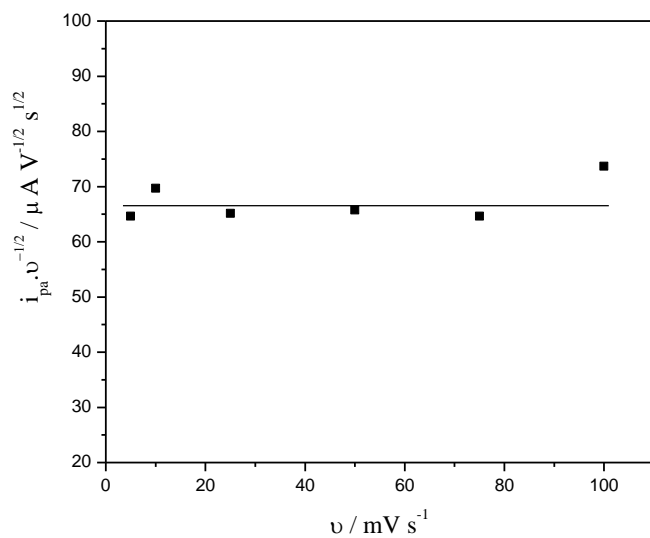


Figura 9. Variação da função corrente ($i_{pa} \cdot v^{-1/2}$) do pico de oxidação da cafeína com a velocidade (v) para uma solução $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cafeína em HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

3.3. Proposta de mecanismo de oxidação da CAFEÍNA

Hansen e Dryhurst estudaram o processo de oxidação eletroquímica da cafeína em um eletrodo de grafite pirolítico (**EGP**) utilizando um conjunto de técnicas como coulometria, polarografia, cromatografia e espectrofotometria e propuseram um mecanismo de oxidação para a cafeína envolvendo a transferência de 4 elétrons como mostrado na figura 10. [13].

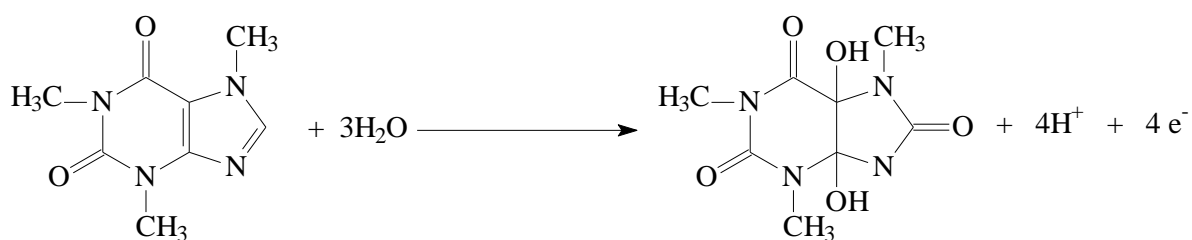


Figura 10. Mecanismo de oxidação da cafeína em meio aquoso.

3.4. Aplicação da metodologia

3.4.1. Otimização das condições experimentais

Outros parâmetros que também influenciam diretamente na resposta da i_{pa} também foram avaliados tais como: tempo de equilíbrio, tempo de agitação, tempo de polimento do eletrodo, pH e eletrólito suporte.

De acordo com os estudos realizados, os parâmetros instrumentais mais adequados para a aplicação da metodologia eletroanalítica para a determinação da cafeína podem ser visualizadas na tabela 2

Tabela 2. Parâmetros experimentais otimizados para a análise da cafeína.

Parâmetros	Valor escolhido
velocidade de variação de potencial	10 mV s ⁻¹
Eletrólito suporte	HClO ₄
pH	1,10
Tempo de equilíbrio (s)	30
Tempo de polimento do eletrodo (s)	90
Tempo de agitação (s)	105

3.4.2 Curva analítica para a cafeína

Usando as condições de trabalho otimizadas para o procedimento proposto foi construída uma curva de calibração para a cafeína. A figura 11 mostra a curva obtida dentro da faixa de concentração de $4,00 \times 10^{-4}$ a $6,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. A curva apresentou linearidade nos intervalos de $4,00 \times 10^{-4}$ a $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e de $1,5^\circ \times 10^{-3}$ a $6,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, ambas com um coeficiente de correlação (**r**) de 0,998 .

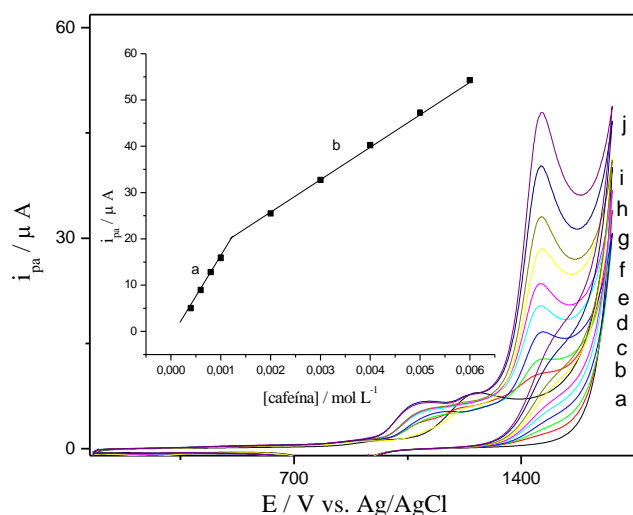


Figura 11. Voltamogramas para diferentes concentrações do padrão de cafeína:

(a) branco; (b) $4,00 \times 10^{-4}$; (c) $6,00 \times 10^{-4}$; (d) $8,00 \times 10^{-4}$; (e) $1,00 \times 10^{-3}$; (f) $1,50 \times 10^{-3}$; (g) $2,00 \times 10^{-3}$; (h) $3,00 \times 10^{-3}$; (i) $4,00 \times 10^{-3}$; (j) $5,00 \times 10^{-3}$ e (k) $6,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Inserção: Dependência da i_{pa} em função da concentração da cafeína.

O limite de detecção (**LD**) e o limite de quantificação (**LQ**) de um método representam respectivamente a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade e a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser determinada de forma quantitativa com precisão e exatidão e são aceitáveis para a validação de um método analítico.

Geralmente a **LOD** e a **LOQ** são calculados a partir das seguintes relações:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot \text{DP}_b}{B} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot \text{DP}_b}{B} \quad \text{Eq. (2)}$$

Sendo **DP_b** o desvio padrão da média aritmética do branco (equação 2), medida no potencial equivalente ao pico da espécie em estudo e **B** é a inclinação da curva de calibração [12,14].

$$DP_b = [\sum (X - \bar{X})^2 \cdot (n - 1)^{-1}]^{-1/2} \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde \bar{X} é a média aritmética de um número de medições, X_i o valor individual de uma medição e n o número de medições.

Utilizando a equação 1 e 2, foi encontrado um **LD** de $8,87 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e um **LQ** de $2,95 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para a reta **a** da curva de calibração da inserção da figura 11 e $2,16 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $7,21 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente para a reta **b** da inserção da figura 11 (tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros quantitativos do método analítico aplicado para a determinação da **CAFEÍNA**.

Faixa de concentração (mol L^{-1})	$4,00 \times 10^{-4}$ - $1,00 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$ - $6,00 \times 10^{-3}$
B ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)	17585	7216
r	0,999	0,999
DP_b (μA)	0,52	0,52
LOD (mol L^{-1})	$9,92 \times 10^{-5}$	$2,16 \times 10^{-4}$
LOQ (mol L^{-1})	$3,31 \times 10^{-4}$	$7,2 \times 10^{-4}$

3.4.3 Determinação da cafeína em formulações farmacêuticas.

Empregando as melhores condições experimentais otimizadas (tabela 2), a metodologia foi aplicada para a determinação da cafeína em uma formulação farmacêutica (Coristina[®] d) através do método de adição do analito.

Na figura 12 estão apresentados os voltamogramas obtidos da adição de 9 mL da amostra de Coristina[®] d dissolvida no eletrólito suporte HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ seguido das adições de 500 μL do padrão de cafeína, respectivamente sobre a amostra.

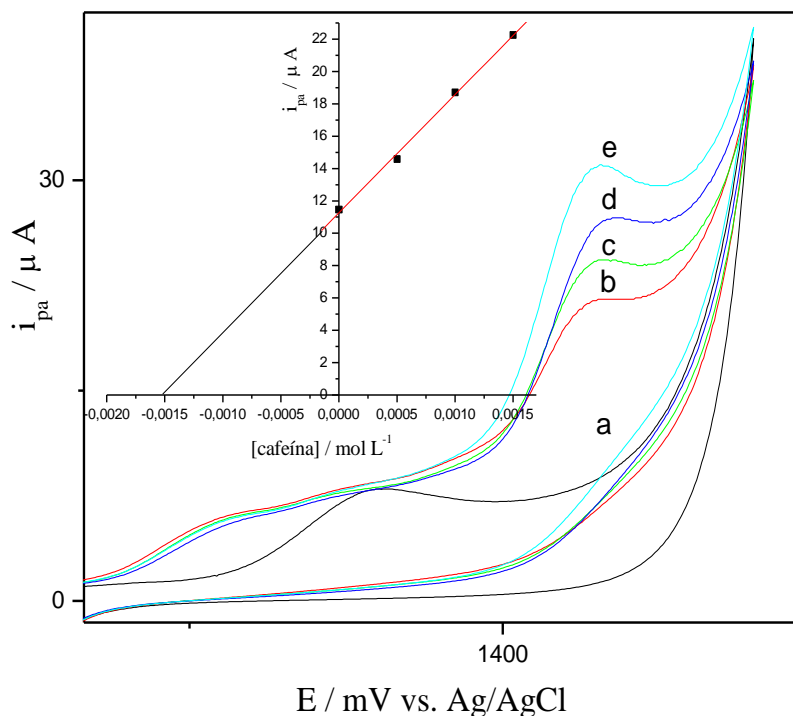


Figura 12. Voltamogramas obtidos para a determinação de cafeína em amostra de comprimido Coristina[®]d. (a) Branco; (b) 9 mL de amostra, (c-e) adição de 500 μ L do padrão de cafeína.

Tabela 4. Parâmetros quantitativos do método analítico aplicado para a determinação da cafeína em formulação farmacêuticas (Coristina[®]d) através do método de adição de padrão.

B (μ A L mol ⁻¹)	7304
r	0,998
DP_b (μ A)	0,28
LOD (mol L ⁻¹)	$1,15 \times 10^{-4}$
LOQ (mol L ⁻¹)	$3,84 \times 10^{-4}$

Comparando o coeficiente angular (**B**) da tabela 4 com o **B** da tabela 3, faixa $1,5 \times 10^{-3}$ - $6,00 \times 10^{-3}$, observa-se que os excipientes contidos na cápsula dos comprimidos não produziram

efeito interferente no sinal analítico mesmo deslocando o E_{pa} para valores mais positivos e diminuindo a i_{pa} .

Os dados obtidos para uma média de três determinações para a quantificação da cafeína na formulação farmacêutica podem ser visualizados na tabela 4. Os valores de desvio padrão relativo (**DPR**) e erro relativo (**E_r**) foram utilizados para expressar a precisão e exatidão, respectivamente, do método proposto [12, 14].

$$\mathbf{DPR} = (DP.\bar{X}^{-1}).100 \quad \text{Eq. (4)}$$

$$\mathbf{E_r} = [(\bar{X}_{\text{encontrado}} - X_{\text{adicionado}}).X_{\text{adicionado}}^{-1}].100 \quad \text{Eq. (5)}$$

Tabela 5. Resultados obtidos para a quantificação de cafeína em amostra de comprimido de Coristina[®]d.

Amostra	Valor rotulado (mg)	Valor encontrado (mg)	Recuperação (%)	DPR (%)	E_r (%)
Coristina [®] d	30,00	30,10	100,30		
	30,00	29,70	99,00	1,35	-1,00
	30,00	29,30	97,70		

DPR = desvio padrão relativo entre os valores encontrados, **E_r** = erro relativo entre o valor rotulado e o valor encontrado.

De acordo com os valores de precisão e exatidão mostrados na tabela 4, verifica-se que estes valores são bastante satisfatórios e indicam a viabilidade de utilização desta metodologia para a determinação de cafeína em formulações farmacêuticas.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nas análises eletroquímicas por **VC** para a cafeína tendo como eletrólito suporte HClO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 1,10, foi possível concluir que o processo de oxidação da cafeína é irreversível sem a ocorrência de reação química acoplada ao processo de transferência eletrônica e a etapa determinante é controlada por transporte de massa difusional.

A oxidação da cafeína sobre o **EAu** permitiu o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação da cafeína em formulação farmacêutica. Nas condições otimizados, o método apresentou rapidez, elevada sensibilidade com um **LOD** de $1,15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, além de precisão ($\text{RSD} = 1,35\%$) e exatidão ($\text{Recuperação} = 99\%$). A determinações da cafeína em formulação farmacêuticas mostrou que esta metodologia, pode ser uma excelente alternativa para o controle de qualidade deste fármaco.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, I. A. *Princípios de Análise Instrumental*. 5 ed., Porto Alegre: Bokman, 2002. 502, 580-581, p.
- [2] BARD, A. J.; FALKNER, L. R. *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. 2-4, 239-242, 833 p.
- [3] ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. São Paulo: Editorial Premier, 1997. 163-167, 204-207
- [4] ZEM, J.-M., TING, Y.-S. *Analytica Chimica Acta*, 1997, **342**, 175-180.
- [5] LAU, O.-W., LUK, S.-F., CHEUNG, Y.-M. *Analyst*, 1989, **114**, 1047-1051.
- [6] ZEN, J.-M., TING, Y.-S., SHIH, Y. *Analyst*, 1998, **123**, 1145-1147.
- [7] SPĂȚARU, N., SARADA, B.V., TRYK, D.A., FUGISHIMA, A. *Electroanalyses*, 2002, **14**, 721-728.
- [8] LEGER, J.-M. *Influence de la structure de l'électrode sur ses propriétés électrocatalytiques: étude comparative de l'adsorption et de l'oxydation du méthanol et de l'acide formique - Thèse de Docteur ès Sciences Physiques*. L'université de Poitiers, 1982.
- [9] AGOSTINHO, S.M.L., VILLAMIL, R.F.V., NETO, A.A., ARANHA, H. *Química nova*, 2004, **27**, 813-817.
- [10] MABOTT, G.A. *Journal of Chemical Education*, 1983, **60**, 697-706.
- [11] BALDWIN, R.P., RAVICHANDRAN, K., JOHNSON, R.K. *Journal of Chemical Education*, 1984, **61**, 820-823.
- [12] TRINDADE, M. A. G. *Estudo do Comportamento Eletroquímico e Determinação da Moxifloxacina Através de Técnicas Voltamétricas - Tese de Mestrado*. UFMS, 2005.
- [13] HANSEN, B.H., DRYHURST, G. *Journal Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1971, **30**, 407-416.
- [14] RIBANI, M., BOTOLLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, C. S. F., MELO, L.F.C. *Química Nova*, 2004, **27**, 771-780.

6. ANEXOS

LISTA DE EQUAÇÕES

$$\mathbf{LOD} = \frac{3.DP_b}{B} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$\mathbf{LOQ} = \frac{10.DP_b}{B} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\mathbf{DP_b} = [\sum (X - X_i)^2 . (n - 1)^{-1}]^{-1/2} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$\mathbf{DPR} = (DP . \bar{X}^{-1}) . 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

$$\mathbf{E_r} = [(\bar{X}_{\text{encontrado}} - X_{\text{adicionado}}) . X_{\text{adicionado}}^{-1}] . 100 \quad \text{Eq. (5)}$$